

学校编码: 10384  
学号: 200326058

分类号\_\_\_\_\_密级  
UDC

厦 门 大 学  
硕 士 学 位 论 文

海洋环己酮降解菌及环己酮降解基因的研究

Cyclohexanone-Degrading Marine Microorganisms and  
Degradation Related Genes

李华

指导教师姓名: 邵宗泽

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2007年6月30日

论文答辩时间: 2007年8月28日

学位授予日期: 2007年 月 日

答辩委员会主席: 郑天凌\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2007年6月

## 厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

# 目 录

中文摘要	I
英文摘要	III
1 前言	1
1.1 21 世纪将是手性技术和手性药物发展的世纪	1
1.2 手性技术的发展情况	2
1.3 Baeyer-Villiger 反应	3
1.4 环己酮单加氧酶 (CHMO)	4
1.5 CHMO 催化机理	9
1.6 环己酮的代谢途径相关基因及 CHMO 在其过程中的作用	10
1.7 环己酮利用菌的 CHMO 基因及部分其他 BVMO 基因的克隆	11
1.8 TYPE 1 型 BVMO 的比较及底物范围的差异	12
1.9 环己酮加氧酶结构与功能的研究	13
1.10 利用环己酮单加氧酶的催化工艺改进	14
1.11 利用环己酮单加氧酶进行天然手性物质合成或生物制药的应用	15
1.12 本论文的研究目的及意义	19
2 材料和方法	21
2.1 材料	21
2.2 基本操作	28
2.3 方法	30
3 结果与讨论	40
3.1 环己酮降解菌 CN1 的筛选及功能研究	40
3.1.1 环己酮降解菌的筛选	40

3.1.2 pH, 盐度, 温度及环己酮浓度对 CN1 生长的影响	40
3.1.3 抗生素抗性范围	42
3.1.4 CN1基因组GC含量测定	42
3.1.5 CN1的碳源利用范围	42
3.1.6 CN1对环己醇, 环己酮, 环戊酮的生物转化	44
3.1.7 厌氧情况下, CN1 对环己酮的降解	45
3.1.8 CN1 对药物中间体双环[3, 2, 0] -2-双键-6-酮的手性转化	45
3.1.9 CN1 环己酮的诱导表达分析	46
3.2.0 CN1 环己酮单加氧酶基因的克隆	47
3.2.1 环己酮降解过程中中间产物的研究	48
3.2.2 CN1 上表现的其他功能	52
3.1.11 讨论	53
<b>3.2 环己酮单加氧酶基因及基因簇的克隆和功能研究</b>	<b>55</b>
3.2.1 CN1 基因组酶切及杂交	55
3.2.2 含 CHNB 的 4.6k 的片段的克隆及鉴定	55
3.2.3 4.6K 核酸片段上的基因排布及特点	56
3.2.4 ChnB, ChnE, 密码子使用的特点	57
3.2.5 ChnA, ChnB 的功能验证	58
3.2.6 CN1 基因组文库的构建	60
3.2.7 CN1 基因文库的筛选与鉴定	60
3.2.8 16C-9, 16F-10 质粒的测序及整个环己酮降解基因簇的拼接	62
3.2.9 对所获基因簇的开放编码阅读框的分析	64
3.2.10 对所获基因簇上非编码区的分析	65
3.2.11 CN1 环己酮加氧酶系统发育分析	67
3.2.12 对 CN1 环己酮加氧酶同源建模分析	68
3.2.13 CHNB 蛋白模型中氨基酸位置总体特征	69
3.2.14 九种环己酮加氧酶核心区域的建模分析	70

3.2.15 对一条重要多肽的分析	71
3.2.16 BVM0 反应机理的推测	74
3.2.17 ChnB 及其缺失突变在大肠杆菌中的表达	75
3.2.18 ChnB 与其他融合标签的共表达	77
3.2.19 His - ChnB 包涵体的复性	78
3.2.20 讨论	80
<b>3.3 利用 5 种碳源对印度洋热液口泥样的菌群富集和单菌分离</b>	<b>82</b>
3.3.1 菌群分析	82
3.3.2 在属的水平上对筛选的手段及结果的分析	85
3.3.3 在富集筛选的过程中从表观发现的几株比较有特点的菌	87
3.3.4 用 GC-MS 检测 55 株菌对环己酮, 环己醇, 环戊酮, 苯乙酮的转化	88
3.3.5 利用 GC-MS 对其余 61 株菌环己酮降解菌进行筛选	91
3.3.6 通过 southern 杂交验证环己酮降解菌中环己酮加氧酶基因的存在	91
3.3.7 利用 GC-MS 对 19 株菌进行降解性能和降解范围的测定	92
3.3.8 相同 16S 的菌在 GC-MS 分析的差异	93
3.3.9 部分菌 alkB, p450 基因的克隆	94
3.3.10 讨论	95
<b>参考文献</b>	<b>98</b>
<b>致谢</b>	<b>105</b>

# CONTENTS

<b>Chinese abstract</b>	I
<b>English abstract</b>	III
<b>1 Forward</b>	1
1.1 The 21th century is the century of chiral chemistry	1
1.2 The development of chiral technique	2
1.3 Baeyer-Villiger reaction	3
1.4 Cyclohexanone monooxygenase (CHMO)	4
1.5 The catalytic mechanism of CHMO	9
1.6 The genes involved in Cyclohexanone degradation	10
1.7 The CHMO and other members of BVMO	11
1.8 Comparasion of BVMOs of type 1	12
1.9 The structure and the function of CHMO	13
1.10 The improvement of catalytic techniques by CHMO	14
1.11 The applications of CHMO in drug making	15
1.12 The purpose and significance of this thesis	19
<b>2 Materials and methods</b>	21
2.1 Materials	21
2.2 The basic methods	28
2.3 Methods	30
<b>3 Result and discussion</b>	40
3.1 Isolation of cyclohexanone-degradating bacteria CN1 and functional study	40
3.1.1 Isolation of cyclohexanone-degradated bacteria CN1	40
3.1.2 The effect on growth of CN1 by Ph, sanity, temperature, and concentration of cyclohexanone	40

3.1.3	Survival on antibiotics -----	42
3.1.4	determination of GC content of CN1 genome-----	42
3.1.5	The utilized carbon scope by CN1-----	42
3.1.6	Transformation of cyclohexanol, cyclohexanone,cyclopentanone -----	44
3.1.7	Degradaion of cyclohexanone on anaerobic conditions-----	45
3.1.8	The induction of CN1 by cyclohexanone-----	46
3.1.9	To clone the fragment of CHNB gene of CN1-----	47
3.1.10	The other functions of CN1-----	47
3.1.11	Discussion -----	49
<b>3.2</b>	<b>Clone and functional study of CHNB gene and the flanking gene cluster----</b>	<b>51</b>
3.2.1	Digestion of CN1 genome and hybridization-----	51
3.2.2	clone and test 4.6k DNA fragment with CHNB gene in it-----	51
3.2.3	The gene pattern and characteristic of the 4.6k DNA fragment -----	52
3.2.4	The characteristic of code usage in ChnA and ChnB-----	53
3.2.5	Assurance of the function of ChnA and ChnB-----	54
3.2.6	Construction of CN1 genomic library -----	56
3.2.7	Screening and test of CN1 genomic library-----	56
3.2.8	Sequencing plasmid 16C-9 and 16F-10 to get integral cluster-----	58
3.2.9	Analysis of all ORFs in the cluster-----	60
3.2.10	Analysis of all uncoding region in the cluster-----	61
3.2.11	Analysis of the phylogenetic tree of kinds of BVMOs-----	62
3.2.12	Contruction of predicted 3D model of Chn B-----	63
3.2.13	General character of the model-----	64
3.2.14	Comparison of core regions of nine ChnB protein-----	66
3.2.15	Analysis of an important polypeptide-----	67



3.2.16	Speculation on the mechanism of BVMO-----	69
3.2.17	Expression of ChnB and its C terminal truncated ChnB in <i>E.coli</i> -----	71
3.2.18	Fused expression of ChnB with kinds of tags-----	72
3.2.19	Renature of inclusion body of His- ChnB-----	72
3.2.20	Discussion-----	73
<b>3.3</b>	<b>Enrichment and isolation of microorganisms from Indian Ocean hydrothermal vent-----</b>	<b>76</b>
3.3.1	Analysis of bacterial community -----	76
3.3.2	Analysis of methods and results based on genus level-----	79
3.3.3	Some special bacterium judged by appearance -----	81
3.3.4	Four substrate transformed by 55 bacterium-----	82
3.3.5	The differences analyzed by GC-MS from bacterium with same 16S-----	85
3.3.6	Clone of alkB and P450 from part of bacterium-----	85
3.3.7	Discussion-----	86
	<b>Reference-----</b>	<b>89</b>
	<b>Acknowledgement-----</b>	<b>96</b>

## 深海环己酮降解菌及环己酮降解基因的研究

### 摘要

“21 世纪是手性化学发展的世纪”，2001 年诺贝尔化学奖就授予分子手性催化的主要贡献者。很多药物及生物活性物质是具有手性特征的，手性制药是目前医药行业的前沿领域和高速增长的领域，是各大制药企业竞争的热点之一，手性技术也是 21 世纪势必快速发展的领域。不仅仅是医药领域，食品，化工，微电子，材料，等众多领域都会因为手性技术的发展得到巨大改变。而目前所有手性催化剂中，将酮催化为具有手性的酯的最佳催化剂是在不动杆菌中发现的环己酮单加氧酶。

本文从太平洋深海获得了一株可利用环己酮为唯一碳源进行生长的微球菌 CN1，该菌不仅表现出除转化环己酮外的诸多性能。如不具有致病性，生长速度快，而且可耐受高浓度环己酮 (>44%)，并且在 16%(V/V)的环己酮中生长最好。CN1 可在 12m M 的重铬酸钾中生长，可利用高浓度氰化钾 (250mM)，还能产生植物生长素——吲哚乙酸。而 CN1 表现的最重要的功能是，它可以高转化率，高手性率的将极为廉价的非手性药物中间体双环[3, 2, 0] -2-双键-6-酮加氧转化为极为昂贵的手性酯，生成物与反应物的市场价格相差近 1000 倍。

不同于已有报道，环戊酮却不能被 CN1 转化，表明 CN1 中的环己酮加氧酶有着较为特别的底物利用范围。环己酮可被 CN1 降解，环己醇可转化为环己酮后降解，环己醇又阻碍自身通过环己酮途径降解。环己酮在氧气不充足或环己酮较多的情况下，转化为环己醇。通过分析环己酮降解的中间代谢产物发现，环己酮有多种途径进行代谢，不仅可通过  $\beta$ -氧化途径降解，通过转化为环己醇后合成其他物质，还有可能直接水解。

通过 Southern 杂交，结合基因组文库构建，获得了环己酮降解的完整基因簇。整个基因簇与具有高 GC 含量的红球菌，节杆菌的基因簇比较接近，而与目前研究的较深入的不动杆菌的基因簇无论从单个基因还是基因排布还是调控基因的类型上都差别很大。通过反转录结合 PCR 发现 CN1 的这个基因簇与阿拉伯

糖操纵子有很高的相似性，其两个启动子紧挨着位于基因簇中部，并在环己酮诱导的情况下向相反的方向转录。利用 GC-MS 验证环己醇脱氢酶和环己酮加氧酶的转化功能，并且还发现在环己醇脱氢酶与环己酮加氧酶共表达的条件下，前者的活性远远高于后者。在大肠杆菌中异源表达了 CN1 的环己酮单加氧酶，发现大都形成了包涵体，通过稀释复性从而获得了有活性的酶。

通过构建了 CN1 环己酮单加氧酶及所有 BVMO 家族蛋白的三维结构模型，结合系统发育分析，发现 BVMO 家族蛋白中心相当保守，发现并推测一条保守的多肽对于酶的性质影响很大，不认同一些学者对 BVMO 催化中心的见解，提出了 BVMO 蛋白有额外的底物结合区，和新的催化机理模型。

此外，通过组合碳源，富集培养基，筛选培养基等要素，从印度洋热液口的一个泥样中分离到 30 个属的 116 株细菌，其中 16 株菌的 16SRNA 序列与网上比对的最高相似度低于或等于 97%。通过 GC-MS 检测发现其中有 19 株可转化环己酮，随机选 9 株菌进行 southern 杂交验证，发现这些菌中确实含有环己酮加氧酶。与已报道的筛菌方法相比不仅开创了新的环己酮降解菌的高效筛选方法，而且在一个泥样中获得的环己酮降解菌的数目为全世界已发表的环己酮降解菌的总和的两倍。另外还研究了包括 CN1 的 20 株菌的降解范围和降解效率。

通过扩增烷烃羟化酶 alkB 和细胞色素氧化酶 P450，发现这两个基因与环己烷的降解存在正相关性。

关键词： 环己酮单加氧酶；微球菌； 生物转化

## Cyclohexanone-Degrading Marine Microorganisms and Degradation Related Genes

### ABSTACT

“The 21th century is the century of chiral chemistry”, the Nobel Price was donated to the main contributor of the asymmetric catalysis in 2001. Many medicament and biological active substance has the chiral character. Chiral-drug making is hot spot in which economic soars nowadays, as well as a hot spot that allures the pharmaceutical company to compete vehemently, The chiral technique certainly will also develop rapidly in the new century. Not only pharmaceutical industry will benefit from chiral technique ,kinds of fields like food, chemistry , microelectronic et.al will all change amazingly by this tequnique. While, maybe to anybody`s surprise ,the best asymmetric catalyst that transform cyclic ketone to chiral lactone is cyclohexanone monooxygenase in *Acinetobacter*.

A cyclohexanone-degrading bacterium, *Micrococcu letus* CN1, was obtained by screening with cyclohexanone as the sole carbon source from the strains originally isolated from Pacific Ocean sediment. Except for cyclohexanone degradation ,it shew many other functional merit,for example ,it can grow rapidly at room temperature ,and the OD<sub>600</sub> can reach about 15 after 48h`s culture, the optimal growth conditions were determined as 25℃-37℃, pH 6-9, salinity 6%. It can tolerate high concentration of cyclohexanone (44%), and grew most vigorously in medium containing 16.7% cyclohexanone (V/V), it can grow well in medium with 12mM potassium dichromate and 250mM potassium cyanide, respectively. Additionally, It can generate auxin (IAA).

CN1 can transform cyclohexanol to cyclohexanone, and then degraded and mineralized cyclohexanone quickly. But different with previously reported cyclohexanone degraders, this strain can not degrade cyclopentanone, indicating that the cyclohexanone monooxygenase was responsible for the difference. Additionally, cyclohexanol can inhibit cyclohexanone degradation to some degree. On anaerobic conditions, cyclohexanone can also be transformed to cyclohexanol. All of these indicate that there is complex mechanism and subtle regulation involved in cyclohexanone degradation by CN1.

The whole gene cluster for cyclohexanone degradation was obtained by Southern blotting combined with genomic library construction. The cluster is similar to the counterpart in *Phodococcus* and *Arthrobacter*, who also have high content of GC. But, the cluster is very different from the counterpart in well studied *Acinetobacter* in gene sequence, gene pattern, type of regulator. The cluster is similar to arabinose operator in ORF pattern, location and transcriptional direction of predicted promoter. The transformational functions of cyclohexanol dehydrogenase and cyclohexanone monooxygenase was tested by GC-MS. The activity of cyclohexanol dehydrogenase is much higher than that of cyclohexanone monooxygenase as co-expression. The cyclohexanone monooxygenase was expressed in *E. coli* alone via various expression vectors. All the protein expressed formed inclusion body, and the activity was obtained by dilution renature.

The predicted three-dimensional models of CN1 cyclohexanone monooxygenase and all other monooxygenases of BVMO family were constructed. Combined with analysis of their homology, the center of BVMO was found very conservative, and a conservative polypeptide was supposed to affect the activity of enzyme deeply, opinions of many scholars was denied, the extra locus for substrate combination was proposed, and a new

model explaining catalysis mechanism emerged.

Additionally, 116 isolates of 30 genera were isolated from sediment of Indian Ocean by recombination of factors like carbon source, culture medium for enrichment, medium plate for isolation et, al. 55 isolates from them were selected to transform cyclopentanone, cyclohexanone, cyclohexanol and phenylacetone, ten bacteria of them can degrade cyclohexanone completely, six bacteria of them can degrade phenylacetone, five bacteria can transform cyclohexanone to cyclohexanol with no further degradation, five bacteria can transform cyclohexanol to cyclohexanone with no further degradation. The alkane hydroxylase alkB and cytochrome P450 were shown to positively correlate to cyclohexane degradation.

Key words: cyclohexanone monooxygenase, micrococcus, biotransformation

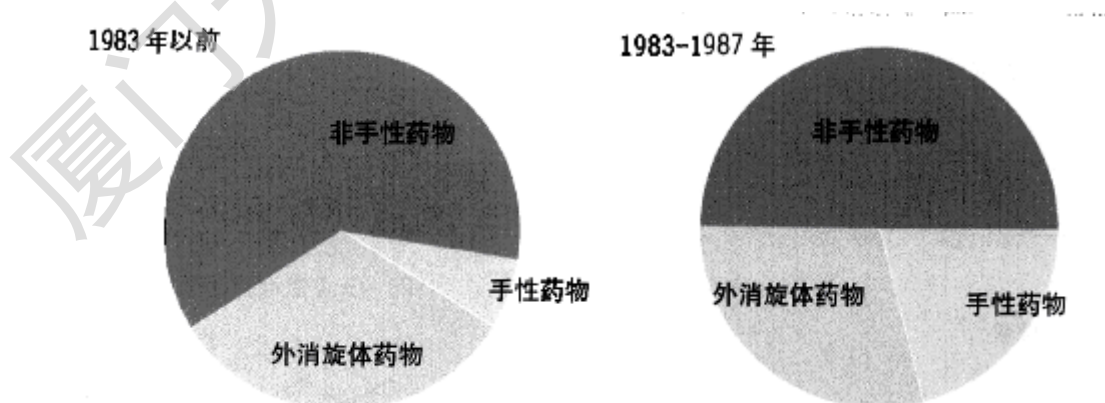
厦门大学博士论文摘要库

## 1 前言

### 1.1 21 世纪将是手性技术和手性药物发展的世纪

自然界里有很多手性化合物，这些手性化合物具有两个对映异构体。对映异构体很像人的左右手，看起来非常相似，但是不完全相同。当一个手性化合物进入生命体时，它的两个对映异构体通常会表现出不同的生物活性。对于手性药物，一个异构体可能是有效的，而另一个异构体可能是无效甚至是有害的。手性制药就是利用化合物的这种原理，开发出药效高、副作用小的药物，其市场前景十分广阔。美国 FDA 发布的手性药物指导原则，要求所有在美国上市的消旋体类新药，生产者均需提供报告，说明药物中所含的对映体各自的药理作用、毒性和临床效果。欧共体国家及日本、加拿大等国随后也规定了类似的法规<sup>[1]</sup>。

手性制药不仅是目前医药行业的前沿领域，也是 21 世纪势必快速发展的领域。2001 年诺贝尔化学奖就授予分子手性催化的主要贡献者。手性药物并不陌生，例如：氧氟沙星和左氧氟沙星，还有很多药物具有手性，象胃安、丙氧吩、巴比妥、兰索拉唑等。图一展示了手性药物的发展势头。





Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库